

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г.Волова
« _____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
Аппаратурно-технологическая схема постферментационной стадии опытного
производства СФУ

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	<u>доцент, к.т.н. С.В.Барановский</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия
Выпускник	_____	<u>А.А. Никонова</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>доцент, к.т.н. В.А.Кожухов</u>
	подпись, дата	инициалы, фамилия

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Литературный обзор	7
1.1 Необходимость исследования и производства полимеров биологического происхождения	7
1.2 Полигидроксиалканоаты – характеристика, свойства	8
1.3 Методы производства и исследования ПГА в мире	12
1.4 Экстракция полигидроксиалканоатов	15
1.4.1 Экстракция растворителями	15
1.4.2 Использование детергентов в экстракции ПГА	16
1.4.3 Механический способ экстракции	17
1.4.4 Применение сверхкритических флюидов.	19
1.4.5 Применение ферментов	19
1.4.6 Биологический метод экстракции ПГА	20
1.4.7 Применение щелочей, и гипохлорита натрия	21
1.4.8 Метод селективной флотации	21
1.5 Выбор метода экстракции	22
2 Материалы, методы и оборудование	25
2.1 Технологический процесс получения биомассы	26
2.1.1 Подготовка технологических сред	26
2.1.2 Ферментация инокулята	27
2.1.3 Ферментация биомассы	28
2.1.4 Концентрирование и сушка биомассы	29
2.1.5 Расчет удельной скорости биомассы	29
2.2 Выделение полимера	30
2.3 Методика отбора проб	32
2.3.1 Доведение фарфоровых чашек до постоянной массы	34
2.3.2 Отбор пробы	34
2.3.3 Расчет выхода экстрактивных веществ.	34

2.3.4 Измерение количества ПГА в экстракте ДХМ	35
2.3.5 Измерение вязкости экстракта ДХМ	36
2.4 Вакуумная дистилляция	37
2.5 Ректификация	38
2.6 Статистическая обработка полученных результатов	41
3. Результаты.....	42
3.1 Культивирование микроорганизмов	42
3.2 Обработка биомассы этанолом.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Экстракция полимера дихлорметаном.	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Влияние концентрации ПГА в экстракте на реологию..	Ошибка! Закладка не определена.
3.4оборот этанола и дихлорметана. Применение вакуумной дистилляции	Ошибка! Закладка не определена.
3.5 Экономическое обоснование стадии упаривания.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.6 Аппаратурная и технологическая схемы постферментационной стадии опытного производства СФУ	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ	45
РЕКОМЕНДАЦИИ.....	47
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	48
ПУБЛИКАЦИИ	54

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме: «Аппаратурно-технологическая схема постферментационной стадии опытного производства СФУ» содержит 69 страниц текстового документа, 19 иллюстраций, 8 таблиц, 8 формул и 50 использованных источников.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОМАССА, ЭКСТРАКЦИЯ, АППАРАТУРНАЯ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СХЕМЫ, ПОЛИГИДРОКИАЛКАНОАТЫ, ПОЛИМЕР, *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B10646.

Цель работы: Разработать аппаратурную и технологическую схему процесса экстракции ПГА на опытном производстве СФУ.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

1. Получить образцы биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646.
2. Исследовать процесс экстракции ПГА из биомассы бактерий. Провести анализ затрат и возврата этанола и дихлорметана в процессе экстракции, а также предложить возможные варианты снижения расхода растворителей на производстве.
3. На основании проведенных исследований предложить технологию и аппаратурное оснащение процесса экстракции ПГА.

Актуальность исследования заключается отсутствии метода экстракции, отвечающего требованиям безопасности и эффективности процесса. Ввиду этого, предложено внедрение стадии вакуумной дистилляции посредством использования роторного испарителя для процесса экстракции полимера из бактерий *C. eutrophus* B-10646. Внедрение данной стадии позволит сократить потери растворителей и тем самым повысить экономическую рентабельность предприятия, а также сократить выброс токсичных веществ в окружающую среду.

ВВЕДЕНИЕ

Получение экологически чистых материалов с необходимыми свойствами остается одной из главных проблем современности. Разработка, создание и освоение новых материалов, не вредящих окружающей среде и включающихся в биосферные круговоротные циклы, соответствует концепции экологически безопасного устойчивого промышленного развития. [1].

Биополимеры - это материал, который сможет заменить синтетические пластики. Эти полимеры природного происхождения необходимы в современном мире. Ему можно задавать необходимые свойства и использовать во многих сферах науки и промышленности.

В последние годы изучению ПГА уделяется огромное внимание благодаря их потенциальному применению в различных областях – от сельского хозяйства до медицины, так как по сравнению с обычными пластиками, получаемыми из нефти, ПГА разрушаются в аэробных/анаэробных условиях и являются биосовместимыми материалами. Однако сравнение ПГА с другими эквивалентными коммерциализированными материалами (например, синтетические полимеры или нефтехимические пластики) показывает, что ПГА достаточно дорогие материалы. Хотя технология культивирования и процесс экстракции полимера с каждым годом совершенствуются, в промышленном масштабе производство ПГА пока не может соревноваться с синтетическими пластиками [2].

Значительную роль в общей стоимости производства полигидроксиалканоатов (ПГА) играет способ выделения полимера из клеточной биомассы. При выборе метода необходимо учитывать стоимость реагентов, количество образующихся отходов, эффективность извлечения полимера, степень его чистоты. В настоящее время используют следующие подходы для выделения полимера: экстракцию органическими растворителями;

обработку биомассы растворами щелочей, кислот, детергентов, ферментами, а также их различные сочетания [3].

В настоящее время не существует технологии экстракции, которая соответствовала бы следующим требованиям:

- невысокая стоимость реагентов;
- малое количество отходов;
- экологичность производства;
- большая эффективность извлечения полимера;
- высокая степень чистоты полимера (99,8%).

Цель: Разработать аппаратную и технологическую схему процесса экстракции ПГА на опытном производстве СФУ.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Получить образцы биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646.
2. Исследовать процесс экстракции ПГА из биомассы бактерий. Провести анализ затрат и возврата этанола и дихлорметана в процессе экстракции, а также предложить возможные варианты снижения расхода растворителей на производстве.
3. На основании проведенных исследований разработать наиболее целесообразную технологию и аппаратное оснащение процесса экстракции ПГА.

1 Литературный обзор

1.1 Необходимость исследования и производства полимеров биологического происхождения

Объемы выпуска неразрушаемых в природной среде синтетических материалов, главным образом полиолефинов (полиэтиленов и полипропиленов), получаемых в процессах нефтеоргсинтеза, огромны, и к настоящему моменту достигли 300 млн. т. в год и ежегодно возрастают примерно на 25 млн. т. Основная их часть складывается на свалках, под которые отчуждаются плодородные земли. Помимо этого, полиэтиленовый мусор выводит из строя канализационные и дренажные системы городов, загрязняет водоемы.

Одним из путей снижения антропогенного давления на экосистемы является замена синтетических полимеров новыми материалами, которые подвержены биологической деградации и разлагаются в естественной среде до безвредных для окружающей среды продуктов, вовлекаясь в глобальные круговоротные циклы. Как вариант, способный воплотить данную идею в жизнь - это биополимеры, которые получают из возобновляемых ресурсов и которые синтезируются живыми организмами [4;5].

Конструирование биополимеров за последние десять-пятнадцать лет превратилось в одно из основных междисциплинарных исследований. Главной целью данного направления работ является:

- 1) поиск и изучение новых биополимеров;
- 2) получение фундаментальной основы для конструирования биологических систем, синтезирующих полимеры с заданными свойствами.

Биодеградирующие полимеры привлекают производителей и экологов тем, что разлагаются в сжатые сроки – от нескольких месяцев до нескольких лет, с образованием безопасных для окружающей природы веществ, таких как

вода, биомасса, углекислый газ или метан (в зависимости оттого, какой процесс разложения имел место – анаэробный или аэробный) [6].

1.2 Полигидроксиалканоаты – характеристика, свойства

Полигидроксиалканоаты (ПГА) - биополимеры микробиологического происхождения, обладают многими свойствами, делающими эти полимеры перспективными для различных сфер промышленности и науки.

Привлекательность ПГА обусловлена наличием существенных преимуществ этого класса полимеров перед другими биоматериалами:

- высокая биосовместимость ПГА связана с тем, что мономер, образующий данный полимер (3-гидроксимасляная кислота) - это естественный метаболит клеток и тканей организмов;

- ПГА не гидролизуются в жидких средах, т.к. деградация ПГА является биологической и происходит клеточным и гуморальными путями. Образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого закисления тканей и, следовательно, выраженной воспалительной реакции;

- изделия из ПГА, в зависимости от формы и места имплантации *in vivo*, могут функционировать от нескольких месяцев до 2-3 лет, более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;

- ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов);

- сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина;

- ПГА - это семейство полимеров различной химической структуры, образованных мономерами с длиной С-цепи от C_4 до C_{12} и выше, от высококристаллических термопластов до конструкционных эластомеров;

- свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру полимера;

- ПГА подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами [1].

В ходе исследований было установлено, что полигидроксиспирты синтезируются с различными выходами многими прокариотическими микроорганизмами с использованием различных субстратов (сахаров, метанола, углеводов, смесей водорода и углекислоты и т.д.). Однако для промышленного применения было выделено всего несколько высокопродуктивных и перспективных штаммов микроорганизмов:

- водородоокисляющие бактерии *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*;
- азотфиксаторы *Azotobacter vinelandii*;
- псевдомонады *Pseudomonas oleovorans*;
- метилотрофы *Methylobacterium organophilum* [1].

Список микроорганизмов, способных аккумулировать ПГА, насчитывает свыше 300 штаммов. Среди описанных организмов - аэробные и анаэробные бактерии, гетеротрофы, фототрофные прокариоты, аэробные фотобактерии, археобактерии и другие. К настоящему моменту накоплен огромный материал, связанный с конструированием и исследованием генетически модифицированных организмов - продуцентов ПГА.

В качестве критериев для выбора потенциального продуцента ПГА принято рассматривать следующие показатели: химический состав, выход полимера, затраты углеродного субстрата, концентрацию биомассы клеток в культуре, продуктивность процесса. [7].

Еще одно открытие - способность микроорганизмов к синтезу сополимерных ПГА стало сильным импульсом для расширения исследований данных биополимеров. Было обнаружено, что присутствие 3-гидроксивалерата в ПГА существенно влияет на характеристики полимера, снижая температуру плавления и кристалличность, делая его более эластичным, упругим и удобным для переработки [1].

Таблица 1 - Природные и рекомбинантные штаммы бактерий и субстратов, используемые для пилотных и промышленных способов получения ПГА.

Штамм		Тип ПГА	Источник углерода	Выход ПГА (%)
<i>Ralstonia eutropha</i>	Природный штамм	ПЗГБ	Глюкоза	80
<i>Alcaligenes latus</i>	Природный штамм	ПЗГБ	Глюкоза или сахароза	75
<i>Escherichia coli</i>	Рекомбинантный штамм	ПЗГБ	Глюкоза	80
<i>Ralstonia eutropha</i>	Природный штамм	ПЗГБ/ЗГВ	Глюкоза - пропионат	75
<i>Ralstonia eutropha</i>	Природный штамм	ПЗГБ/4ГБ	Глюкоза+ бутин-диол	80
<i>Escherichia coli</i>	Рекомбинантный штамм	ПЗГБ/4ГБ	1,4 - Бутандиол	75
<i>Ralstonia eutropha</i>	Рекомбинантный штамм	ПЗГБ/ЗГГ	Жирные кислоты	80
<i>Alcaligenes latus</i>	Природный штамм	ПЗГБ/ЗГГ	Лауриновая кислота	50
<i>Bacillus spp.</i>	Природный штамм	ПЗГБ	Сахароза	50

Большинство из открытых типов гидроксикислот, образующих ПГА, детектированы в качестве составляющего продукта биосинтеза. При анализе всего многообразия полигидроксиалканоатов установлено, что полимеры, синтезированные биологическим путем, имеют R-конфигурацию и не имеют L-конфигурации. В целом, исходя из длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры той или иной структуры, ПГА подразделяют на три основные группы:

1) короткоцепочечные - ПГА_{кц} (short-chain-length, SCL), состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3 до 5 углеродных атомов;

2) среднецепочечные - ПГА_{сц} (medium-chain-length, MCL), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;

3) длинноцепочечные - ПГА_{дц} (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот C₁₇ и C₁₈.

Так же существует огромный потенциал для синтеза разнообразных по составу ПГА, который связан с возможностью генетического конструирования рекомбинантных штаммов-продуцентов, в которых агрегируют гены из различных продуцентов [1].

Одно из важнейших свойств ПГА - это его биоразлагаемость. Именно на этот параметр возлагаются большие надежды, как на помощника сохранения и восстановления экологии.

В институте биофизике СО РАН при СФУ проводились лабораторные исследования, которые помогли пролить свет на особенности деградации ПГА различной химической структуры в почве. Так как один из факторов этого параметра - это присутствие определенных микроорганизмов - деструкторов, проводился поиск данных микроорганизмов и изучение влияния разных штаммов на скорость и качество разрушаемости полигидроксиалканоата [8;9].

Биоразлагаемость полимеров очень важна для области медицины, ведь их деструкция протекает в организмах при действии внутриклеточных и внеклеточных ферментов (деполимераз), в результате чего образуется усваиваемые клетками гидромасляная и гидроксивалериановая кислоты. Их дальнейшее преобразование в аэробных условиях завершаются образованием воды и углекислого газа. Это открывает перспективы в области фармакологии (адресная доставка лекарств, шовные материалы) [10].

1.3 Методы производства и исследования ПГА в мире

При производстве биodeградируемых пластиков следует учитывать требовательность микроорганизмов к условиям, в которых их культивируют. Так же методы производства варьируются от требований, предъявляемых к материалам.

Одним из наиболее распространенных биопластиков на основе полиэфиров гидроксикарбоновых кислот является полилактид (полимолочная кислота, ПЛА). Существует несколько методов получения ПЛА: прямая поликонденсация молочной кислоты и полимеризация лактида, полученного из олигомера молочной кислоты .

Метод получения полилактида прямой поликонденсацией молочной кислоты в среде азеотропирующего растворителя толуола в присутствии кислых и металлосодержащих катализаторов является малоэффективным, так как образуется продукт с низкой молекулярной массой.

Метод получения полимолочной кислоты из лактида (олигомеризация молочной кислоты, лактидизация олигомера молочной кислоты и полимеризацию лактида с раскрытием цикла) дает продукт с высокой молекулярной массой. [11].

Так же проводились исследования в институте биофизики СО РАН при СФУ о возможности и перспективности биосинтеза ПГА содержащих мономеры 3-гидрокси-4-метилвалерата. Изучены свойства полигидроксиалканоатов при добавлении этих мономеров [12].

Среди активных разработчиков процессов производства ПГА – различные фирмы, компании и корпорации, включая Монсанто Ко, Metabolix Inc., Tepha, Procter & Gamble, Berlin Packaging Corp., Bioscience Ltd., BioVentures Alberta Inc., Merck, выпускающие полимеры под марками Biopol®, BiopolTM, TephaFLEX™, DegraPol/btc®, Nodax™ (таблица 2) [4].

Таблица 2 - Зарубежные компании, ориентированные на производство ПГА.

Компания	Типы ПГА	Масштаб производства (т/год)	Период времени	Применение
«ICI» (Великобритания)	ПЗГБ/ЗГВ)	300	1980-1990 гг.	Упаковка
«Chemie Linz» (Австрия)	П(ЗГБ)	20-100	1980-е гг.	Упаковка, доставка лекарств
«Biomers» (Германия)	П(ЗГБ)	Неизвестно	1990-е гг. до настоящего времени	Упаковка, доставка лекарств
«BASF» (Германия)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	Пилотный масштаб	1980-е гг. до 2005 г.	Смешивание с Esoflex
«Metabolix» (США)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	Неизвестно	1980-е гг. до настоящего времени	Упаковка
«Terpha» (США)	Различные ПГА, в т.ч. ПЗГБ/4ГБ)	Неизвестно	1990-е гг. до настоящего времени	Медицинские биоимпланты
«ADM» (США) (с «Metabolix»)	П(ЗГБ), ПЗГБЗГВ)	50 000	с 2005 до настоящего времени	Сырье
«P&G» (США)	Среднецепочечные ПГА	Изготавливает по контрактам	1980-е гг. до настоящего времени	Упаковка
«Meridian» (США)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	10 000	с 2007 г. до настоящего времени	Сырье
«Капека» (Япония) (с P&G)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	Неизвестно	1990-е гг. до настоящего времени	Упаковка
Компания	Типы ПГА	Масштаб производства (т/год)	Период времени	Применение
«Mitsubishi» (Япония)	П(ЗГБ)	10	1990-е гг.	Упаковка

Окончание таблицы 2

«Biocycles» (Бразилия)	П(ЗГБ)	100	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Bio-On» (Италия)	ПГА	10 000	с 200S до настоящего времени	Сырье
«Zhejiang Tian Ап» (Китай)	ПЗГБ/ЗГВ)	2 000	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Jiangmen Biotech Ctr» (Китай)	П(ЗГБ/ЗГГ)	Неизвестно	1990-е гг.	Сырье
«Yikeman. Shandon» (Китай)	П(ЗГБ)	3 000	с 2005 г. до настоящего времени	Сырье
«Tiangin Northern Food» (Китай)	П(ЗГБ)	Пилотный масштаб	1990-е гг.	Сырье
«Shantou Lianyl Biotech» (Китай)	Различные ПГА	Пилотный масштаб	1990-е до 2005	Упаковка и медицина
«Jian Su Nan Tian» (Китай)	П(ЗГБ)	Пилотный масштаб	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Shenzhen OBioer» (Китай)	Различные ПГА	Неизвестно	с 2004 г. до настоящего времени	Неясно

Ученые из Нигерии (Engineering Materials Development; Department of Chemical Engineering, Obafemi Awolowo University) и США (Hawaii Natural Energy Institute, University of Hawaii) совместно провели исследования по получению полигидроксиалканоатов [13].

В Тайланде продолжается разработка двухступенчатого (фотоавтотрофный и гетеротрофный) культивирования, позволяющее производить биопластик поли-3-гидроксибутират в аутоосаждающихся цианобактериях [14].

Так же ученые открыли возможность производства пластика на мелассе из сахарного тростника в *Enterobacter sp. SEL2* [15].

Так же активно рассматривается вопрос тесной связи полимеризации и деполимеризации полигидроксиалканоатов в обеспечении эффективного

управления углеродными ресурсами, проводятся исследования двух ПГА-синтаз, обнаруженных у *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 [16;17].

Производство биodeградируемых материалов имеет огромные перспективы как для людей, так и для экологии в отдельности. Проводятся многочисленные исследования и попытки найти максимально эффективный и экономный способ производства необходимого материала.

1.4 Экстракция полигидроксиалканоатов

Для извлечения гранул ПГА необходимо разрушить бактериальную клетку и удалить слой белка, покрывающий гранулы ПГА [18]. ПГА является внутриклеточным продуктом, поэтому методы, используемые для его извлечения, фокусируются либо на его солюбилизации, либо на солюбилизации неполимерных клеточных материалов (НПКМ) [19]. НПКМ состоящие из нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов, пептидогликана и белковых материалов, так же будут отделены от полимера в процессе извлечения [20].

1.4.1 Экстракция растворителями

Наиболее часто используемый метод выделения ПГА это экстракция растворителями, а именно восстановление ПГА из клеточной биомассы. Этот метод также обычно используется в лаборатории из-за его простоты и быстроты. Проводится в два этапа:

- а. Модификация проницаемости клеточной мембраны (позволяет высвободить и солюбизировать ПГА);
- б. Осаждение без растворителя (например, гексаном).

При данном методе используются такие растворители как хлороформ, 1,2- дихлорэтан, 1,2-пропиленкарбонат, метил-трет-бутиловый эфир, дихлорметан, негалогеновые растворители (пропионат, бутират, изоамилвалерат и т.д).

Этанол и метанол используются как нерастворители для осаждения ПГА. Еще одним преимуществом данного метода является способность удалять бактериальный эндотоксин. Так же при экстракции растворителями деградация полимеров незначительна, что позволяет получить ПГА с высокой чистотой и молекулярной массой.

К сожалению, широкомасштабное применение экстракции с помощью растворителей обычно рассматривается как метод, не являющийся экологически чистым. Кроме того, существуют другие факторы, препятствующие использованию растворителей (высокие капитальные и эксплуатационные расходы).

Другой проблемой является высокая вязкость экстрагированного раствора полимера, когда концентрация Р(ЗНВ) превышает 5% (мас./Об.). Такая вязкость раствора препятствует удалению клеточного дебриса, что приводит к длительному процессу разделения. Также существует вероятность того, что экстракция растворителем может нарушить уникальное зарождающееся состояние гранул Р(ЗНВ), которые могут быть полезны в некоторых применениях.

Существует опасность выброса большого количества токсичных летучих растворителей в окружающую среду в случае аварии, что так же вызывает опасение и озабоченность. [18;21].

1.4.2 Использование детергентов в экстракции ПГА

Один из подходов получения полимера (который называют «безреагентным») заключается не в его экстракции из биомассы клеток, а в удалении загрязняющих компонентов (белков, углеводов). [22]. Использование анионных детергентов, таких как додецилсульфат натрия, может привести к разложению любых нерастворимых веществ, таких как белки и липиды, а также к солюбилизации компонентов посредством включения в мицеллы [23].

Дальнейшее поступление ПАВ разрывает мембрану для того чтобы мицеллы проникли в фосфолипидный слой, что приведет к отделению клеточного мусора от ПГА. Еще одна функция ПАВ заключается в солюбилизации. ПАВ солюбилизирует не только белки, но и другие, не содержащие ПГА структуры.

Преимущество этого метода исходит из того, что поверхностно-активные вещества проводят лизис клеток без ухудшения качества полимерных гранул, оставляя молекулы ПГА нетронутыми, что является главной целью процесса экстракции. Еще одно несомненное преимущество метода – отпадает необходимость в использовании токсичных растворителей [24;25].

Метод также имеет свои недостатки: высокая стоимость детергентов. Кроме того, метод требует большого количества детергентов на грамм ПГА для извлечения полимера и большого количества воды, чтобы произвести промывку биомассы [26].

1.4.3 Механический способ экстракции

Механическое разрушение клеток широко используется для высвобождения внутриклеточного белка. Эта концепция так же была протестирована для извлечения ПГА из бактериальных клеток. В отличие от других методов извлечения, механическое разрушение предпочтительнее, главным образом, из-за экономической выгоды и мягкого повреждения продуктов. Механическое разрушение клеток не связано с химическими веществами, поэтому оно минимизирует загрязнение окружающей среды. Недостатками данного метода являются высокая стоимость капиталовложений, длительное время обработки и трудности в расширении производства. [18;27;28].

Среди различных механических методов разрушения лидируют два основных метода: таких как размол в шаровой мельнице и гомогенизации под высоким давлением.

Принцип шаровых мельниц основан на сдвиговом действии и переносе энергии от шариков к ячейкам в зонах контакта. Ключевыми параметрами, которые влияют на процесс разрушения, являются загрузка борта и диаметр борта. Степень разрушения клеток также зависит от множества параметров, таких как распределение времени пребывания, силы сдвига, типа микроорганизмов, концентрации клеток, скорости подачи суспензии, скорости мешалки, геометрии камеры измельчения и конструкции мешалки. Данный метод был рекомендован для восстановления РНА, так как он требует меньшего количества энергии. Основная проблема заключается в том, что необходимо принять во внимание большое количество факторов для создания хорошей системы разрушения клеток [18].

Гомогенизация под высоким давлением приводит к разрушению клеточной суспензии через регулируемый клапан с ограниченным отверстием. Необходимо контролировать многие параметры процесса, чтобы добиться эффективного результата. Проводились исследования, при которых извлечение Р(ЗНВ) из *A.latus* с помощью гомогенизатора ниже, чем при экстракции шаровыми мельницами из-за тяжелой микронизации. Тем не менее, полимер был извлечен с чистотой 95% и выходом 98% из экстракта вязкостью 5% (мас. / Об.). Микробиологические параметры, а именно тип и фаза роста микроорганизмов, концентрация клеток также влияют на эффективность разрушения. Как правило, грамположительные бактерии более трудно разрушать по сравнению с грамотрицательными бактериями. Среди недостатков, связанных с данным методом, включают возможность термического разложения желаемых продуктов и образования тонких клеточных дебрисов, которые будут мешать дальнейшей последующей обработке гранул РНА [18].

1.4.4 Применение сверхкритических флюидов.

Сверхкритические флюиды (СКФ) в настоящее время представляют огромный интерес в биотехнологических процессах. Они обеспечивают решение кардинальных проблем, связанных с нетепловой клеточной инактивацией, ферментативной инактивацией, клеточной проницаемостью и извлечением продуктов брожения. Применение сверхкритических флюидов является простым, недорогим и, что более важно, безвредным для структур и функций ферментов (алкоголь дегидрогеназы, инвертазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фумаразы, активности белков). Сверхкритический диоксид углерода (СК-СО₂) является наиболее широко используемой жидкостью с низкой критической температурой кипения (31.1 °C) и давлением (73 бара), что делает его идеальным средством для обработки летучих продуктов. Он недорогой, легко доступен, обладает низкой реакционной способностью. Сверхкритический флюид используется для извлечения почти 90% ПГА в биомассе с чистотой от 86 до 99% [29]. Нетоксичность, негорючесть, селективность процесса и легкость выделения полимера являются наиболее важными характеристиками [30]. Данный способ является перспективным, поскольку используется меньше растворителя для разрушения клеток в сравнении с другими методами выделения, при этом он является более благоприятным для экологии [31].

1.4.5 Применение ферментов.

Существует способ использования ферментов, свободных от химических добавок для выделения и очистки ПГА, ферментированного на грамотрицательных бактериях *Ralstonia eutropha* DSM 545. Изучены ферменты протеаз, такие как трипсин, химотрипсин, папаин и бромелайн, β-глюкоцидаза, целлюлаза и лизоцим. В экспериментах, в которых последовал выбор ферментов, направленных на нахождение оптимальной температуры, pH и

концентрации фермента, была достигнута высокая эффективность в солюбилизации безполимерной биомассы и, следовательно, в выделении и очистке ПГА. В результате экспериментов установлено, что протеазы оказались наиболее подходящими ферментами для солюбилизации и очистки ПГБ полимерных бактерий *R. Eutropha* (выход полимера при использовании трипсина составил 89 %). Высокая эффективность и низкая стоимость использования трипсина делают его перспективным ферментом для крупномасштабных производств [32]. Тем не менее, высокая стоимость ферментов и сложность процесса извлечения перевешивают его преимущества [33].

1.4.6 Биологический метод экстракции ПГА

В качестве еще одного энергосберегающего метода экстракции предлагается использовать мучных червей *Tenebrio molitor*. В данном эксперименте, лиофильно высушенные бактериальные клетки *C. necator*. С уже синтезированным ПГА используют в качестве корма для червей *Tenebrio molitor*. Мучные черви содержались в пластиковых контейнерах при температуре окружающей среды. Белесые фекальные гранулы, выделяемые червями, собирали, просеивали с использованием сита 0,5 мм и сушили в течение ночи в сушильном шкафу при 60 °С. последующим восстановлением полимера из фекалий. Собранные фекальные гранулы с ПГА, подвергали последующей очистке с использованием воды или 1% (w/v) SDS (без нагревания и при 50 °С).

Биологически извлеченные гранулы ПГА, промытые водой, получали с чистотой 89 %. Чистота гранул ПГА достигала 100 %, когда их обрабатывали 1% SDS и 1 % SDS при 50 °С.

Так как данный метод малоизучен, необходимы дальнейшие исследования направленные на оптимизацию процесса и определение

возможности этого биологического метода экстракции в промышленном масштабе [34].

1.4.7 Применение щелочей, и гипохлорита натрия

Биомассу бактерий можно предварительно обрабатывать щелочным раствором или раствором гипохлорита натрия, который солюбилизирует молекулы, не содержащие полигидроксиалканоатов, оставляя сами молекулы ПГА неповрежденными [35]. Затем, ПГА могут быть отделены от раствора центрифугированием. Но в процессе обработки гипохлоритом натрия наблюдается серьезная деградация полимера, которая заключается в 50% снижении молекулярного веса [36]. Эта технология довольно проста, однако, учитывая заметное снижение молекулярной массы ПГА вследствие использования гипохлорита натрия, который является сильным окислителем и содержит заметное количество хлора, который остается в выделенных гранулах ПГА, данный метод был модифицирован различными способами многими исследователями. Один из вариантов модификаций включает в себя использование дисперсионного раствора, изготовленного из гипохлорита натрия и хлороформа [23]. В некоторых случаях хлопья ПГА, выделенные из переваренных клеток, были дополнительно обработаны озоном или перекисью для удаления загрязняющих веществ [29].

1.4.8 Метод селективной флотации

Выделение ПГА из бактерий *Pseudomonas putida*, ферментированных путем брожения, может осуществляться методом селективной флотации. Чистота процесса зависит, главным образом, от селективности процесса агрегации и воздействия неселективного транспорта воды для создания пузырьков воздуха, растворенного в воде. Наблюдаемую агрегацию частиц смеси можно объяснить с помощью расширенной ДЛФО теории (Ван-дер-

Ваальсовых, электростатических и гидрофобных взаимодействий) только когда учитывается отталкивание щеточного узла. Эта дополнительная сила отталкивания, скорее всего, играет решающую роль в предотвращении агрегации при определенных условиях. Агрегаты, образовавшиеся вблизи изoeлектрической точки клеточных отходов и включений в ПГА, обеспечили высокую чистоту полимера. С этими агрегатами чистота в 86% была получена в трех последовательных сериях флотации, где вклад неселективного транспорта в жидкой фазе был существенным. Показано, что без неселективного транспорта чистота полимера в этом процессе будет доходить до 95%.

Количество выделенного полимера, в основном, зависит от фракции полимерных включений, которые не объединяются и слишком малы по своим размерам для эффективной флотации [37].

1.5 Выбор метода экстракции

Были рассмотрены различные методы экстракции и проведен анализ, с целью выбора наиболее выгодного и эффективного метода:

1. Экстракция растворителями:

- Преимущества: дает возможность получить ПГА высокой частоты и молекулярной массы.

- Недостатки: небезопасный с точки зрения экологии, приходится использовать большие количества летучего растворителя, большая вязкость полимера (концентрация более 5%).

2. Экстракция детергентами:

- Преимущества: поверхностно-активные вещества проводят лизис клеток без ухудшения качества полимерных гранул, отпадает необходимость в использовании токсичных растворителей.

- Недостатки: высокая стоимость детергентов, а так же необходимость большого количества детергентов на грамм ПГА для извлечения полимера и большого количества воды, чтобы произвести промывку биомассы.

3. Механический способ экстракции:

- Преимущества: не связано с химическими веществами.
- Недостатки: высокая стоимость капитальных инвестиций, длительное время обработки и трудности в крупнотонажном производстве.

4. Использование сверхкритических флюидов:

- Преимущества: нетоксичность, негорючесть, селективность процесса и легкость выделения полимера, используется меньше растворителя для разрушения клеток в сравнении с другими методами выделения.
- Недостатки: данным метод плохо изучен.

5. Использование ферментов:

- Преимущества: высокая эффективность и низкая стоимость использования трипсина.
- Недостатки: высокая стоимость ферментов в целом и сложность процесса извлечения полимера.

6. Биологический метод экстракции:

- Преимущества: экологичный способ, высокая эффективность
- Недостатки: необходимы дальнейшие исследования направленные на оптимизацию процесса и определение возможности этого биологического метода экстракции в промышленном масштабе.

7. Применение щелочей и гипохлорита натрия:

- Преимущества: простота технологии.
- Недостатки: наблюдается серьезная деградация полимера, которая заключается в 50% снижении молекулярного веса, токсичность используемых веществ.

8. Метод селективной флотации:

- Преимущества: чистота полимера при использовании данного метода будет достигать до 95%.
- Недостатки: количество выделенного полимера зависит от фракции полимерных включений, которые не объединяются и слишком малы по своим размерам для эффективной флотации

Из всего выше перечисленного можно сделать вывод, что экстракция растворителями является наиболее оптимальной. Данный метод дает возможность получить ПГА высокой частоты и молекулярной массы.

Проблема с необходимостью использовать большие количества летучего растворителя решается путем возврата большей части данных растворителей.

2 Материалы, методы и оборудование

В качестве рабочего материала используется биомасса бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 в виде лиофильно высушенного порошка с влажностью 2-3% (рис.1, рис.2). Для данной работы используется оборудование опытного производства полимеров, находящееся в лаборатории биотехнологии новых материалов на базе СФУ.

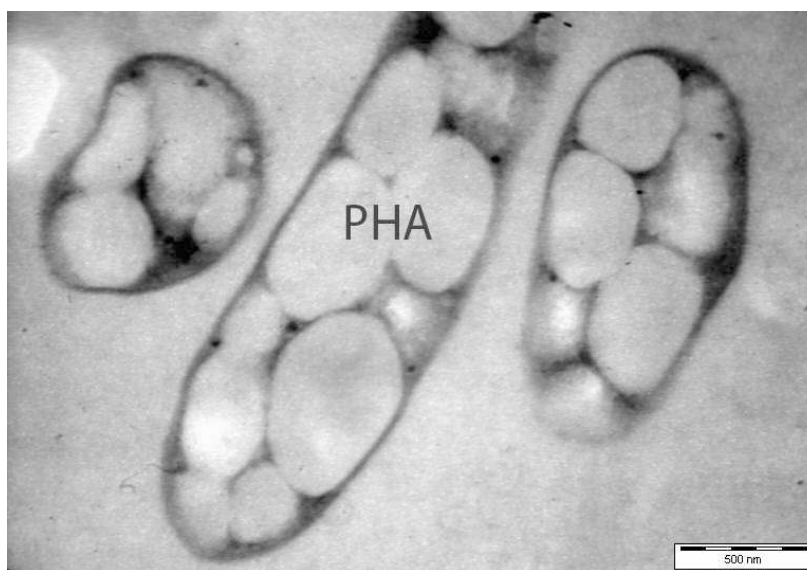


Рисунок 1 - Микрофотография бактерий *C. eutrophus* B-10646



Рисунок 2 - Лيوфильно-высушенная биомасса бактерий *C. eutrophus* B-10646

2.1 Технологический процесс получения биомассы

2.1.1 Подготовка технологических сред

А) Получение воды очищенной

Для получения воды очищенной и дальнейшего ее асептического хранения используется установка arium® comfort I и arium® bagtank «Sartorius Weighing Technology».

Б) Подготовка сжатого воздуха

Воздух используется как источник кислорода в процессах культивирования. Воздух подается компрессором СБ4/Ф-150.OL150П ЗАО «REMEZA» под давлением 0,8 МПа по трубопроводу условным диаметром 20 мм (материал полипропилен) через воздушный фильтр.

В) Подготовка пара

Пар используется в качестве теплоносителя для стерилизации фильтров и ферментёров, и в качестве нагрева терморубашки ферментёров.

Для подготовки пара используется парогенератор тэновый SP 850 NYO SEUNG

Г) Подготовка питательных растворов

В качестве минеральной среды используется смесь из четырёх маточных растворов:

- Приготовление фосфатного буфера. Расчётное количество фосфата калия и фосфата натрия растворяют в дистиллированной воде при перемешивании. Расчётное количество представлено в таблице 3;

Таблица 3 - Компоненты фосфатного буфера

Компоненты	1л H₂O (дист.)
Na ₂ HPO ₄	9 г
KH ₂ PO ₄	1,5 г

- Навеску сульфата магния растворяют в дистиллированной воде;
- Навеску железа лимоннокислого вносят в ёмкость, дистиллированной водой и кипятят до полного растворения. Затем раствор доводят водой до метки;
- в мерную колбу объемом 2 л вносят поочередно навески солей (H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NiCl_2), доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают до полного растворения. Хранят в холодильнике.

Сульфат магния, железо лимоннокислого и микроэлементы стерилизуют при 121°C, давление 1 атм., в течение 45 минут. Для стерилизации лабораторной посуды, инструментария и материалов используется стерилизатор паровой MLS 3781L.

Растворы глюкозы и мочевины, насосом ISM 1020A ISMATEC, прокачивают через стерильный фильтр Milipore Express SHC со скоростью не более 5 л/мин в стерильные бутылки.

При подготовке среды для культивирования (полная среда Шлегеля) к одному литру фосфатного буфера следует добавить 5 мл раствора сульфата магния, 3 мл раствора железа лимоннокислого, 10 мл раствора микроэлементов.

2.1.2 Ферментация инокулята

На этом этапе происходит получение посевного материала. Музейную культуру, хранящуюся на скошенной агаризованной среде в холодильнике «Бирюса» (плюс 5°C), смывают с поверхности среды (4 пробирки) в конические колбы КН-1-2000 ёмкостью 2 л (16 шт) с полной средой Шлегеля. Оптическая плотность исходного инокулята (без разведения), не менее 0,1 (440 нм). Все работы ведутся с соблюдением асептики.

Колбы закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками и размещают в шейкерах инкубаторах INNOVA44 Eppendorf. Инкубирование проводится в

течение 20 ± 2 ч при температуре плюс $30 \pm 0,5$ до получения оптической плотности не менее $0,2 \pm 0,02$.

2.1.3 Ферментация биомассы

Первая стадия на данном этапе - подготовка к работе ферментера - инокулятора. Ферментёр – инокулятор NLF 22 Bioengineering AG, объемом 30 литров, предназначен для получения не менее 15 л посевной культуры, необходимой для загрузки производственного ферментёра P-150 Bioengineering AG, объёмом 150 литров.

Заранее подготовленный буфер вносят через загрузочный порт. В порт помещают силиконовую мембрану и закрывают ферментер - инокулятор. Далее вентилем открывают подачу пара. Аппаратчиком ферментации в окне функционального блока контроллера температуры запускается процесс стерилизации. Стерилизацию ведут при температуре плюс 120°C , давлении пара 0,11 МПа в течение 45 минут.

Вторая стадия - выращивание биомассы в ферментёре-инокуляторе.

После завершения процесса стерилизации, полученный инокулят стерильно вносят в ферментер-инокулятор. После этого в окне управления ферментёра выставляются параметры процесса ферментации:

- температура плюс $30 \pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$;
- концентрация растворённого кислорода dO 25 ± 7 % (каскадное управление);
- обороты мешалки от 100 до 1000 оборотов в минуту (каскадное управление).

В процессе культивирования аппаратчик должен контролировать концентрацию питательных субстратов (глюкозы и мочевины), а также следить за основными технологическими параметрами: pH, концентрация биомассы, концентрация глюкозы и азота, dO, температура и обороты мешалки.

Третья стадия - трансфер биомассы в производственный ферментер.

Происходит трансфер полученной биомассы. Для трансфера продукта из ферментера-инокулятора в ферментер, объёмом 150 литров (Производственный ферментёр Р-150 Bioengineering AG), необходимо подготовить к работе оборудование. Для этого необходимо присоединить шланг для трансферта одной стороной к разгрузочному патрубку ферментера-инокулятора, другой стороны к трансфертному приемнику производственного ферментера. Паром стерилизовать шланг трансферта. Закрывать клапан отвода воздуха в ферментёре-инокуляторе и открывать клапана трансферта. После трансферта инокулята, закрыть клапана и перевести ферментёр, объёмом 150 литров, в режим культивирования. Далее ферментёр-инокулятор подвергается мойке.

Четвертая стадия - наращивание биомассы и полимера.

Процесс биосинтеза в производственном ферментере происходит в два этапа. На первом этапе происходит культивирование биомассы бактерий, на втором этапе происходит накопление полимера.

2.1.4 Концентрирование и сушка биомассы

После того, как необходимый объем конечного продукта достигнут, биомасса концентрируется в ультрафильтрационной установке (Установка «ВЛАДИСАРТ» тангенциальной ультра- и микрофльтрации на базе АСФ-020 ЗАО «Владисарт»). Сушку биомассы проводят с использованием лиофильной сушилки (Lyoph Pride LP10). Бактериальная паста загружается в поднос-лотки, и проходит лиофилизацию в сушильном аппарате для получения сухой биомассы. Далее высушенная биомасса используется для выделения полимера.

2.1.5 Расчет удельной скорости биомассы

При написании магистерской диссертации в ходе процесса культивирования биомассы проводился расчет удельной скорости роста микроорганизмов:

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{x}{x_0} \right)}{\Delta t} \quad (1)$$

x - конечная концентрация биомассы, г/л;

x_0 - начальная концентрация биомассы, г/л;

Δt - время культивирования, ч.

2.2 Выделение полимера

Исходный образец представляет собой биомассу бактерии *Cupriavidus eutrophus* В-10646 с влажностью не более 3 %, содержащую полимер (в данном эксперименте политригидроксibuтират - ПЗГБ). Составлена схема выделения ПГА (рис.3).

Из лиофильной сушилki высушенная биомасса поступает в отделение экстракции. Содержание ПГА должно составлять не менее 70% от сухой массы клеток.

Происходит экстракция биомассы этанолом при следующих параметрах:

- гидромодуль биомасса:этанол =1:5;
- температура экстракции 70 ± 1 °C;
- обороты мешалки 250 ± 50 оборотов в минуту;
- время экстракции 2-5 часа.

Обработка этанолом биомассы бактерий обезживает клетки и подвергает разрушению бислойные клеточные мембраны. Происходит агрегация липидов внутри нее и накопление воды, что приводит к снижению барьерных функций мембраны [38]. Также происходит ослабление жесткости и структурной организации клетки, она становится менее вязкой и более текучей [39]. В целом, экстракция этанолом позволяет повысить чистоту полимера, а также обеспечить максимальное высвобождение полимерных молекул при экстракции дихлорметаном.

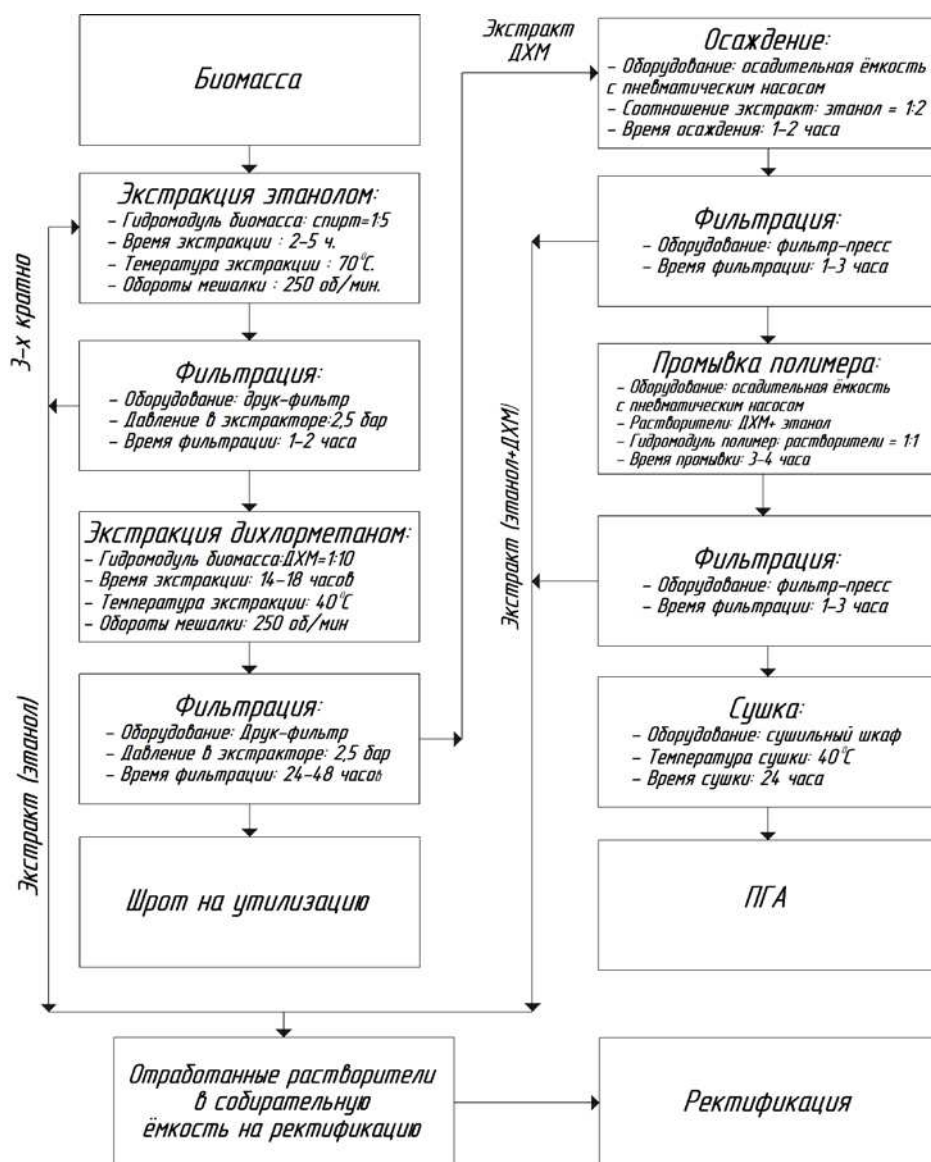


Рисунок 3 - Схема выделения полимера

Далее биомассу фильтруют от экстракта (этанол). Для этого создается давление воздушным компрессором 2,5 бар. через друк-фильтр. Экстракт (этанол) отправляется в собирательную ёмкость на ректификацию, биомасса повторно обрабатывается этанолом. Соотношения и условия экстракции повторяются.

После трехкратной экстракции этанолом происходит экстракция полимера дихлорметаном при следующих условиях:

- гидромодуль биомасса: ДХМ = 1:10;
- температура экстракции $40 \pm 1^\circ\text{C}$;
- обороты мешалки 250 ± 50 оборотов в минуту;
- время экстракции 14-18 часов.

После полученный экстракт (ДХМ) также фильтруется под давлением, создаваемым воздушным компрессором, через друк-фильтр. Жидкая фракция экстракта закачивается в осадитель. Отработанный шрот выгружается из экстрактора и отправляется на утилизацию.

В осадительной ёмкости к полученному экстракту добавляется этанол из расчета 2 части этанола на одну часть экстракта. Далее с помощью пневматического насоса систему перемешивают в течение 1-2 часов. Полученная смесь отправляется на разделение в фильтр-пресс.

После фильтрации полимер выгружается из фильр-пресса и отправляется в осадительную ёмкость на промывку. Соотношение полимера и растворителей (этанол+ДХМ) 1:1. Дихлорметан необходимо добавлять 20% от объема добавленного этанола на промывку. Полученный экстракт (ДХМ-этанол) отправляется в собирательную ёмкость на ректификацию.

Происходит повторная фильтрация смеси ПГА-ДХМ-этанол через фильтр-пресс. Полученный полимер отправляется в сушильный шкаф для удаления остатков растворителей до влажности $\approx 2\%$ (Температура в сушильном шкафу = 40°C). Полученный экстракт (ДХМ-этанол) отправляется в собирательную ёмкость на ректификацию.

2.3 Методика отбора проб

Составлена схема отбора проб, на которой представлены контролируемые параметры (рис.4):

- количество экстрактивных веществ в экстракте (этанол);
- количество экстрактивных веществ в экстракте (ДХМ);
- вязкость экстракта (ДХМ);
- количество ПГА в экстракте (ДХМ).

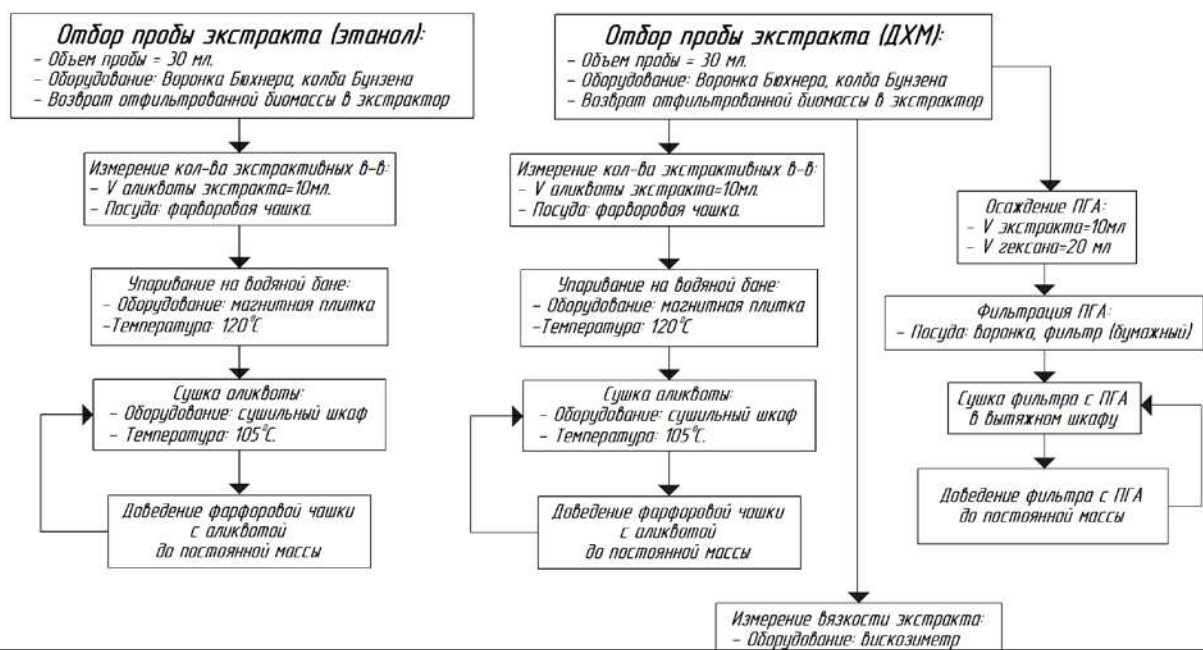


Рисунок 4 - Схема отбора проб

Помимо указанных параметров, также проводился контроль:

- навески биомассы;
- объема спирта, потраченного на экстракцию;
- количество экстрактивных веществ;
- объема экстракта после фильтрации.
- объема ДХМ, потраченного на экстракцию;
- объема экстракта, полученного после фильтрации;
- объема экстракта, полученного после упаривания;
- объема вторичного ДХМ, полученного после упаривания;
- массы шрота после экстракции.
- объема этанола, потраченного на осаждение и промывку;
- объема ДХМ, потраченного на промывку;
- объема экстракта (этанол+ДХМ), полученного после фильтрации ПГА.
- масса полученного ПГА.

Для приведенной схемы составлены методики, описанные ниже.

2.3.1 Доведение фарфоровых чашек до постоянной массы

Брали 10 чистых чашек (предварительно подписанных), взвешивали и в открытом виде помещали в сушильный шкаф на 60 мин при температуре 105 °С, затем чашки помещали в эксикатор на 20-30 минут, охлаждали и взвешивали на аналитических весах. Далее чашку помещали в сушильный шкаф и через 60 минут повторяли ту же операцию охлаждения и взвешивания. Данная процедура проводилась до тех пор, пока разница между результатами двух взвешиваний не превышала 0,0001 г.

2.3.2 Отбор пробы

Брался бумажный фильтр и помещался в воронку Бюхнера. После воронку с фильтром и колбу Бунзена подсоединяли к вакуумному насосу. При помощи воронки, колбы и насоса происходило отделение экстракта (этанол, ДХМ) от биомассы. Биомасса возвращалась в экстрактор, а от отфильтрованного экстракта отбиралась аликвота объемом 10 мл при помощи пипетки или мерного цилиндра.

2.3.3 Расчет выхода экстрактивных веществ.

Для упаривания аликвоты использовались термостойкий стеклянный стакан с дистиллированной водой, который помещался на магнитную плитку.

Фарфоровая чашка с отобранной аликвотой помещалась наверх стакана. Температура магнитной плитки устанавливалась 120⁰С. Данная процедура проводилась до полного испарения этанола или ДХМ из аликвоты.

Фарфоровую чашку с упаренной аликвотой помещали в сушильный шкаф и проводили высушивание в течение 5 часов, после чего чашку с пробой вынимали из сушильного шкафа пинцетом, охлаждали в эксикаторе 20-30 минут и взвешивали на аналитических весах. Далее чашку с пробой помещали в

сушильный шкаф и через 60 минут повторяли ту же операцию охлаждения и взвешивания. Данная процедура проводилась до тех пор, пока разница между результатами двух взвешиваний не превышала 0,0001 грамма.

Далее проводился расчет выхода экстрактивных веществ для экстракта этанол и экстракта ДХМ:

1. Выход экстрактивных веществ в экстракт этанол

$$X_n = \frac{a_n * 100}{m} \quad (2)$$

X_n – количество экстрактивных веществ относительно АСБ, %;

a_n – количество экстрактивных веществ, вышедших в этанол при экстракции, г;

m – масса навески АСБ, г;

n – номер экстракции.

2. Выход экстрактивных веществ в экстракт ДХМ:

$$x_n = \frac{a_n * 100}{m} \quad (3)$$

x_n – Общее количество экстрактивных веществ относительно АСБ, %;

a_n – Общее количество экстрактивных веществ, вышедших в ДХМ при экстракции, г;

m – масса навески АСБ, г;

n – номер экстракции.

2.3.4 Измерение количества ПГА в экстракте ДХМ

Проводился аналогичный отбор экстракта ДХМ. Отобранная аликвота экстракта ДХМ объемом 10 мл осаждалась этанолом при гидромодуле 1:2. Полученный полимер фильтровался при помощи заранее взвешенного бумажного фильтра и стеклянной воронки.

Проводилось предварительное высушивание бумажного фильтра в сушильном шкафу в течении 15-20 часов. Далее бумажный фильтр помещался в сушильный шкаф на 60 минут при температуре 40⁰С, после чего фильтр с ПГА

помещали в эксикатор на 20-30 минут, охлаждали и взвешивали на аналитических весах. После фильтр помещали в сушильный шкаф и через 60 минут повторяли ту же операцию охлаждения и взвешивания. Данная процедура проводилась до тех пор, пока разница между результатами двух взвешиваний не превышала 0,0001 г.

Далее проводился расчет количества ПГА относительно АСБ:

$$p_n = \frac{b_n * 100}{m} \quad (4)$$

p_n – Количество ПГА в экстракте ДХМ относительно АСБ, %;

b_n – Масса ПГА, выделенного из пробы, г;

m – масса навески АСБ, г;

n – номер экстракции.

После полученных данных о общем количестве экстрактивных веществ в экстракте этанол и количестве ПГА расчет остальных экстрактивных веществ проводился по формуле:

$$l_n = x_n - p_n \quad (5)$$

l_n – Количество экстрактивных веществ, вышедших в ДХМ, относительно АСБ, %;

x_n – Общее количество экстрактивных веществ относительно АСБ, %;

p_n – Количество ПГА в экстракте ДХМ относительно АСБ, %;

2.3.5 Измерение вязкости экстракта ДХМ

Проводился отбор аликвоты объемом 30 мл в мерную стеклянную посуду. Для измерения вязкости использовался вискозиметр со следующими установленными параметрами:

- опция «Measurement Conf»;
- тип шпинделя: L1;
- скорость вращения шпинделя: 30 об/мин;

Измерение вязкости проводилось в течении 5-10 минут. Для предотвращения испарения ДХМ посуда с пробой закрывалась фольгой.

После полученных данных проводился пересчет вязкости из динамической в приведенную:

1. Относительная вязкость [40]:

$$\mu_o = \frac{\mu_d}{0,435} \quad (6)$$

Где μ_d - динамическая вязкость экстракта (мПа*с)

0,435 - динамическая вязкость исходного раствора ДХМ (мПа*с) [4]

2. Удельная вязкость [40]:

$$\mu_v = \frac{\mu_d - 0,435}{0,435} \quad (7)$$

Где μ_d - динамическая вязкость экстракта (мПа*с)

0,435 - динамическая вязкость исходного раствора ДХМ (мПа*с) [4]

3. Приведенная вязкость [40]:

$$\mu_p = \frac{\mu_v}{C} \quad (8)$$

Где μ_v - удельная вязкость;

C - концентрация полимера в растворе (г/л)

2.4 Вакуумная дистилляция

Большие потери дихлорметана в процессе экстракции ПГА являются проблемой по двум причинам:

- материальные затраты на процесс экстракции ПГА;
- выбросы токсичного вещества в окружающую среду.

В ходе работы поставили задачу:

- сократить материальные затраты на выделение полимера, и, соответственно, увеличить возврат дихлорметана в процесс, что также сократит выбросы токсичных веществ;

Для решения данных проблем использовалась вакуумная дистилляция (вакуумная перегонка).

Вакуумная перегонка — один из методов разделения смесей органических веществ. Данный метод используется в том случае, когда дистилляция не может быть осуществлена при атмосферном давлении из-за высокой температуры кипения целевого вещества (это приводит к термическому разложению перегоняемого продукта).

Различают два основных метода вакуумной перегонки:

1. *Стандартная вакуумная перегонка* (при грубом и среднем вакууме: 700...10⁻² мм рт. ст.), применяется в химических лабораториях и на производствах наиболее часто;

2. *Молекулярная перегонка* (при высоком вакууме: 10⁻⁴...10⁻⁵ мм рт. ст.), применяемая для разделения высокомолекулярных веществ (с массой до 1200), или для низкомолекулярных термически лабильных веществ.

Снижение температуры кипения жидкости, достигаемое уменьшением давления, способствует сохранению перегоняемого вещества от разложения.

Для данного процесса могут применять роторные вакуумные испарители. Их использование необходимо в случае разгонки жидкости, которая не терпит даже кратковременного перегрева. Роторные испарители существенно увеличивают скорость перегонки [41].

При постановке эксперимента использовали роторный испаритель Buchi Rotovarov R 215, находящийся в лаборатории при следующих параметрах:

- Температура водяной бани = 50⁰С;
- Давление = 930 мбар;
- Скорость вращения ротора = 200 оборотов.

2.5 Ректификация

При выполнении магистерской диссертации также поставили задачу провести анализ затрат (указать основные потери) и возврата этанола и

дихлорметана в процессе экстракции, предложить возможные варианты снижения расхода растворителей на производстве

Ректификация — это процесс разделения двойных или многокомпонентных жидких смесей на практически чистые компоненты за счёт противоточного массо- и теплообмена между паром и жидкостью [42].

Ректификация выполняется в ректификационной колонне. Таковая состоит преимущественно из трубчатой разделительной колонны, испарителя (перегонного куба, низа колонны) и конденсатора в верхней части (голове) колонны. В разделительной колонне размещены встроенные элементы, обеспечивающие интенсивный контакт пара с жидкостью.

Подлежащая разделению жидкостная смесь для кипения помещается в перегонный куб. Образующийся при этом пар проходит по встроенным элементам вверх и после выхода из верха колонны конденсирует в конденсаторе. Конденсат в виде возвратного продукта (флегмы) возвращается в голову колонны и стекает там каплями по встроенным элементам в нижнюю часть колонны. Остаток конденсата покидает установку в виде низкокипящего продукта.

В собственно разделительной колонне паровая смесь устремляется вверх, а конденсат противотоком стекает вниз. При этом между паровой смесью и кипящей жидкостью происходит тепло- и массообмен из струящихся вверх паров конденсирует высоко кипящий компонент, соответственно накапливаясь в стекающей вниз жидкости. Выделяющееся при этом тепло конденсации вызывает испарение из жидкости низкокипящих компонентов, которые, в свою очередь, концентрируются в поднимающихся вверх парах. Результатом является то, что стекающая в нижнюю часть колонны жидкость содержит прежде всего высококипящие компоненты, а устремленный в голову колонны пар состоит преимущественно из низкокипящей жидкости.

Методом ректификации удастся почти полностью разделять даже жидкостные смеси, показывающие лишь минимальный изгиб кривой

равновесия. Поэтому в химической промышленности разделение смесей производят в основном именно по принципу ректификации.

Промышленная ректификационная установка состоит из ряда отдельных аппаратов, в которых выполняется во взаимодействии друг с другом множество различных операций, а именно:

- Кипение и частичное испарение смеси, поступающей в выпарной аппарат.

- Тепло- и массообмен в разделительной колонне между поднимающимся паром и стекающей вниз возвратной жидкостью. При этом происходит разделение смеси на низкокипящий компонент (в голове колонны) и высококипящий компонент, собирающийся в нижней части колонны.

- Конденсация пара, поступающего в конденсатор из верха колонны.

- Разделение конденсата на возвратную жидкость и низкокипящий головной продукт [43].

В ходе выполнения магистерской диссертации составлена схема ректификации растворителей, затраченных на выделение ПГА. Указаны соотношения для этанол:вода и для ДХМ-этанол:вода. Показаны основные этапы проведения ректификации и условия их проведения (рис. 5).

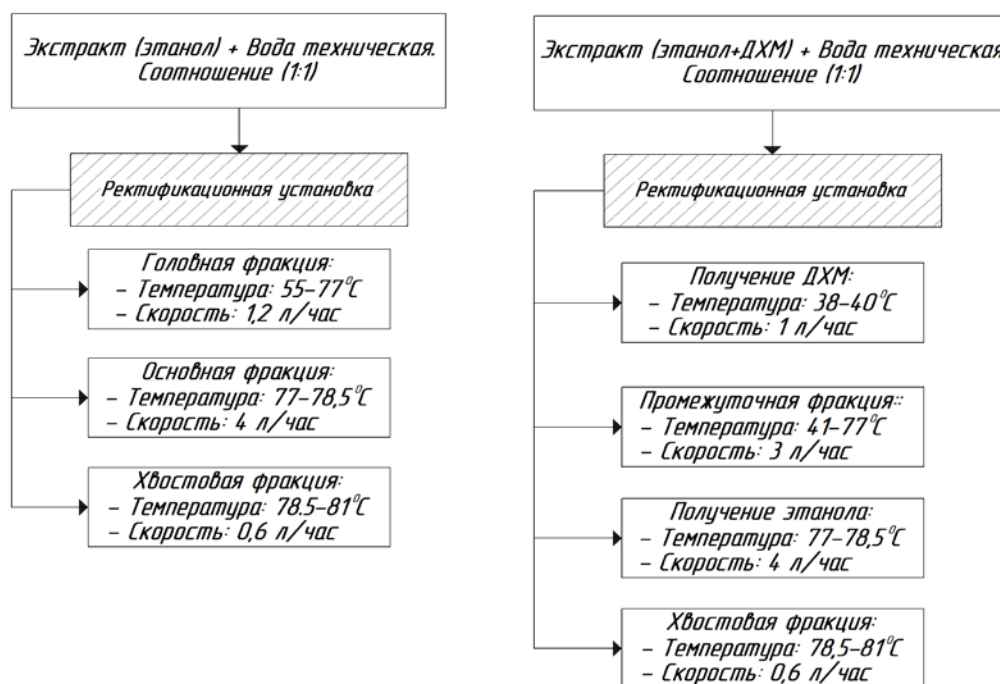


Рисунок 5 - Схема ректификации растворителей

В процессе экстракции ПГА образуются смеси этанола и ДХМ. Для проведения процесса ректификации данные растворители и их смеси разбавляли водой в соотношении 1:1. Таким образом, проводилась возгонка смесей этанол-вода и ДХМ-этанол-вода.

Ректификация этанола из смеси этанол-вода делится на несколько этапов. При температуре от 55 до 77⁰С образуется головная фракция. После идет получение основного продукта при температуре от 77 до 78,5⁰С. По окончании ректификации при температуре 78,5- 81⁰С образуется так называемая хвостовая фракция. Головную и хвостовую фракции утилизировали.

При ректификации ДХМ и этанола из смеси ДХМ-этанол-вода первой стадией является получение вторичного ДХМ при температуре от 38 до 40⁰С. Затем при температуре 41-77⁰С получали промежуточную фракцию, которую утилизировали, а далее проводили ректификацию этанола по уже представленной методике.

2.6 Статистическая обработка полученных результатов

Математическую обработку экспериментальных данных проводили стандартными методами; определяли средние значения результатов; рассчитывали отклонения от среднего значения для каждого результата; дисперсию, стандартное отклонение отдельного результата и стандартное отклонение среднего результата. Проверку надежности полученных результатов определяли по критерию Стьюдента при избранной доверительной вероятности $\alpha = 0,95$. Полученные результаты проверяли по одному из вышеописанных способов (по критериям максимального отклонения Стьюдента) на наличие грубых ошибок. После исключения грубых ошибок производили повторную обработку результатов. Для решения поставленных задач использовалась программа MS Office Excel 2007 с встроенным пакетом анализа данных.

3. Результаты

3.1 Культивирование микроорганизмов

При выполнении магистерской диссертации по результатам процесса культивирования бактерий представлен график накопления биомассы и полимера (рис.6)

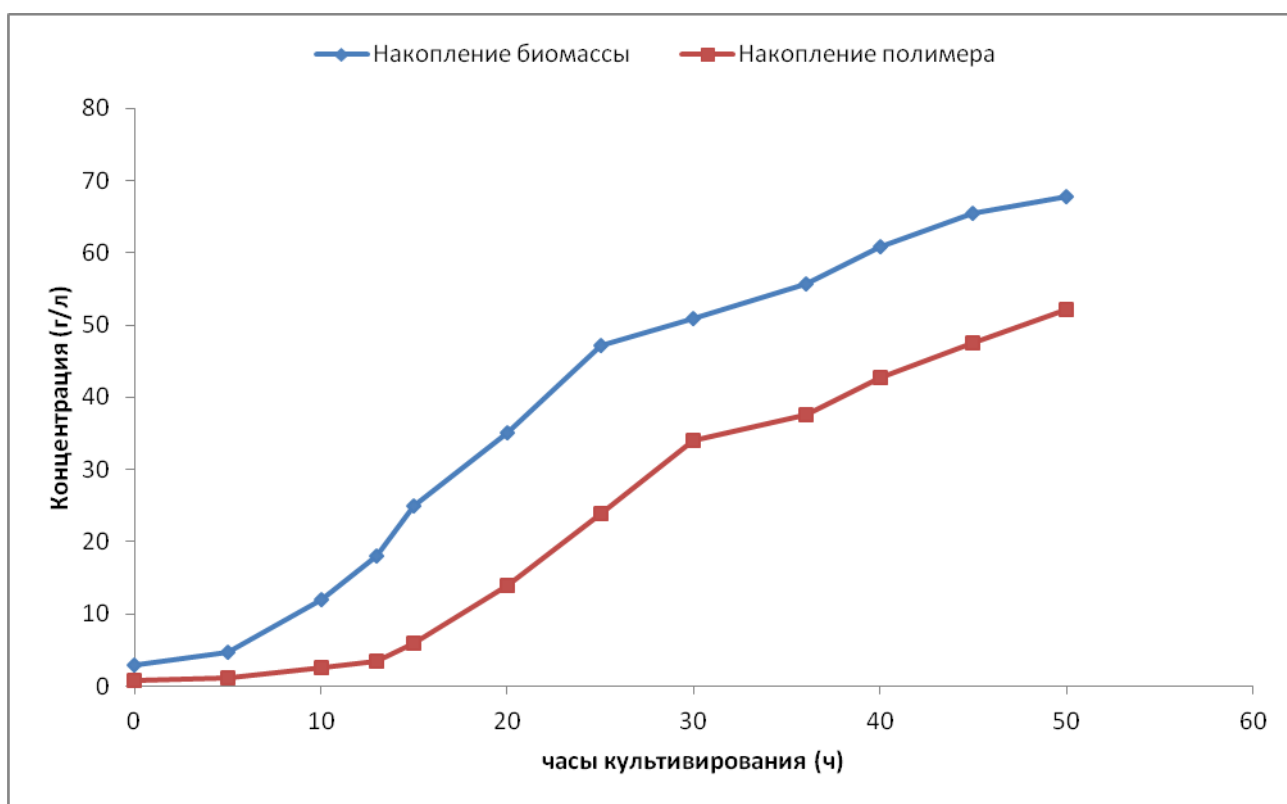


Рисунок 6 - Рост биомассы и накопление полимера

Культивирование проводилось на ферментере объемом 30 л в течении 50 часов, в ходе которых проводился контроль основных параметров, перечисленных в главах 2.1.2, 2.1.3. Сам этап культивирования насчитывает несколько стадий:

Лаг-фаза — фаза «привыкания» клеток к среде, при этом происходит индукция соответствующих ферментов, увеличение количества ДНК и РНК. На данном графике лаг-фаза соответствует 0-5 часа культивирования.

В этой фазе накопление биомассы и полимера практически не происходит, средняя удельная скорость роста биомассы составляет $0,09 \text{ ч}^{-1}$, а удельная скорость накопления полимера составляет $0,06 \text{ ч}^{-1}$.

В экспоненциальной (логарифмической) фазе клетки растут и делятся с максимальной скоростью, их рост не ограничен. На данном графике экспоненциальная фаза соответствует 5-25 часа культивирования.

В этой фазе средняя удельная скорость роста микроорганизмов составляет $0,11 \text{ ч}^{-1}$, максимальная удельная скорость роста достигает $0,15 \text{ ч}^{-1}$.

Экспоненциальная стадия накопления полимера составляет 5- 30 часа культивирования. Средняя удельная скорость накопления равна $0,1 \text{ ч}^{-1}$, а максимальная удельная скорость достигала $0,2 \text{ ч}^{-1}$.

По мере исчерпания субстратов и накопления продуктов обмена скорость роста снижается (*фаза замедления роста или переходная фаза*). На данном графике данная фаза для биомассы соответствует 25-40 часа культивирования. Средняя удельная скорость роста в данной фазе составляет $0,017 \text{ ч}^{-1}$.

Переходная стадия накопления полимера составляет 30-45 часа культивирования, средняя удельная скорость роста равна $0,017 \text{ ч}^{-1}$.

Далее культура переходит в *стационарную фазу*, в течение которой процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии. На данном графике данная фаза для биомассы соответствует 40-50 часа культивирования. Средняя удельная скорость роста составляет $0,01 \text{ ч}^{-1}$.

Стационарная стадия накопления полимера соответствует 45-50 часа культивирования, средняя удельная скорость роста равна $0,007 \text{ ч}^{-1}$ [44].

Накопления полимера обуславливается несбалансированным ростом, (отсутствие одного из конструктивных элементов в среде: азота, фосфатов и др. или при дефиците кислорода), при котором ацетил-СоА не включается в цикл трикарбоновых кислот, а уровень свободного СоА при этом низок. Это является благоприятным условием для активизации ферментов синтеза поли(3-гидроксибутирата) (ПЗГБ).

В синтезе ПГА участвуют ключевые ферменты: 3-кетотиолаза (β -КТ), ацетоацетил-СоА-редуктаза (АА-СоА-редуктаза) и ПГА-синтаза. ПГА ассоциируются в клеточной цитоплазме в виде сферических включений (гранул), количество которых в клетке и размеры могут существенно варьировать в зависимости от условий роста микроорганизма и его систематической принадлежности (рис. 7) и находятся в гранулах в подвижном аморфном состоянии. Количество гранул в клетке может составлять от 2-4 до 12 и более. Гранулы заключены в мембрану толщиной 2-4 мкм и на 98 % состоят из полимера [45].

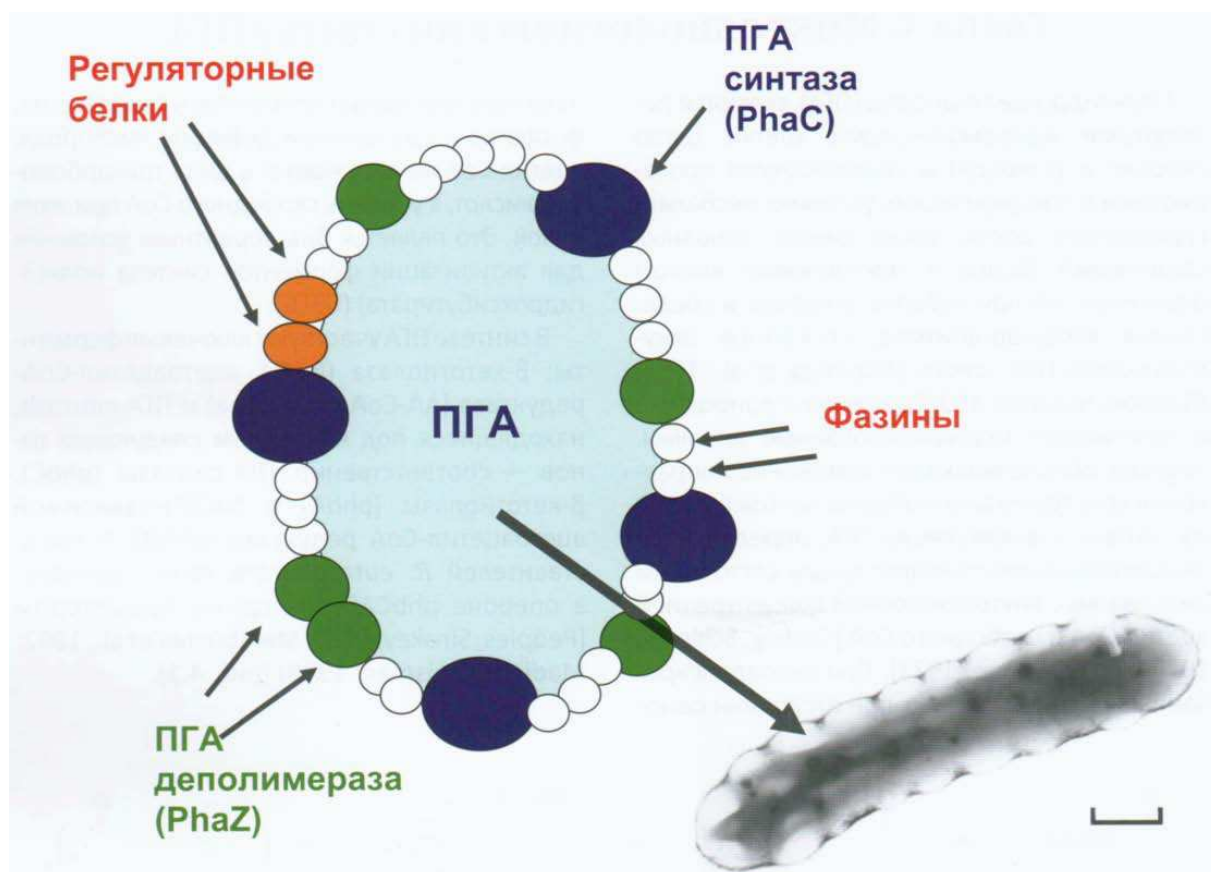


Рисунок 7 - Модель гранулы ПГА. С поверхностью гранулы ассоциированы ключевые белки цикла ПГА (ПГА-синтаза, ПГА-деполимераза, регуляторные белки, фазины); РЭМ-снимок клетки *R. eutropha* B5786 с содержанием полимера свыше 80 %. Маркер 1 мкм

ВЫВОДЫ

1. Освоена технология культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 на опытном производстве ПГА. По результатам проведенного процесса биосинтеза урожай биомассы составил более 67 г/л с содержанием полимера 77%, максимально достигнутая скорость роста составила 0,15 ч⁻¹.

2. В результате исследования процесса экстракции ПГА из биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 и анализа затрат и возврата растворителей:

-изучена динамика выхода экстрактивных веществ из биомассы при экстракции этанолом на первом и дихлорметаном на втором этапе. Установлено, что проведение 3-х кратной экстракции этанолом обеспечивает выход 97% экстрактивных веществ (4,95 % от АСБ). При экстракции ДХМ, на 5 часе процесса выход экстрактивных веществ составил 96,4% от общего выхода. Из них липиды, пептидогликан и т.п. вещества составляют 4,33% от АСБ. Общий максимальный выход экстрактивных веществ без учета выхода ПГА составил 9,59% от АСБ;

- изучена зависимость изменения вязкости экстракта от содержания в нем ПГА и времени экстракции ДХМ. Установлено, что с увеличением содержания ПГА в экстракте вязкость раствора увеличивается;

- установлено, что использование процесса ректификации существенно повышает рентабельность предприятия. Ректификация позволяет вернуть в процесс для вторичного использования 81% этанола и 41,6% ДХМ. Продолжается изучение способов экстракций, существующих в настоящее время, с целью найти наиболее экономичный, безопасный и эффективный метод выделения ПГА.

-показано, что эффективность процесса ректификации растворителей снижается вместе с увеличением компонентов в смеси. Так, ректификация смеси ДХМ-этанол-вода позволяет вернуть этанола на 7,3 % менее в сравнении с возгонкой смеси этанол-вода.

- проведена оценка экономической целесообразности использования вакуумной дистилляции в процесс выделения ПГА. Установлено, что применение в процессе экстракции роторного испарителя позволит сократить затраты этанола на 26,7% и снизить его потери на 23%, увеличить возврат ДХМ в процесс на 27,5%, а также сократить общие потери растворителей на 31,5%.

3. На основании проведенных исследований предложена аппаратная и технологическая схема процесса экстракции ПГА для опытного производства. Также подготовлены рекомендации по повышению эффективности предприятия при переходе с опытного на промышленное производство ПГА.

РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведение 3-х кратной экстракции этанолом является оптимальным для многотонажного производства и обеспечивает выход 97% экстрактивных веществ. Проведение дальнейшей экстракции является экономически нецелесообразным при масштабном производстве.

2. Применение вискозиметра позволяет сократить время проведения экспресс-анализа содержания ПГА в экстракте ДХМ с нескольких часов до 15-20 минут и рекомендовать данный метод для использования в промышленном производстве.

3. Производство ПГА в промышленных масштабах должно предполагать наличие центрифуг для отжима шрота и полимера, а также систему захолаживания оборудования и процессов при использовании ДХМ, с целью уменьшения потерь растворителей и повышения экономической целесообразности предприятия.

4. Процесс регенерации растворителей, применяемых при выделении ПГА из биомассы бактерий в условиях промышленного производства, должен предполагать использование соответствующего ротационного испарителя и ректификационной установки для обеспечения эффективного возврата растворителей в производство и повышения экономической рентабельности предприятия.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Биомедицинский потенциал разрушаемых полигидроксиалканоатов: экспериментально-клинические исследования/Т.Г. Волова, Ю.С. Винник, Е.И. Шишацкая, Н.М. Маркелова. - Красноярск:Версо,2014.-332 с.

2 Волова, Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов [Электронный ресурс]/ Т.Г. Волова// Journal of Siberian Federal University. Biology 2. - 2014. - Красноярск: СФУ,2014. - режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=22296590>, свободный. - Загл. с экрана.

3 Киселев, Е.Г., Демиденко, А.В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий [Электронный ресурс]/ Е.Г. Киселев // Journal of Siberian Federal University. - 2015. - Красноярск: СФУ, 2015. - режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=22296592>, свободный. - Загл. с экрана.

4. Волова, Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов [Электронный ресурс]/ Т.Г. Волова// Journal of Siberian Federal University. Biology 2. - 2014. - Красноярск: СФУ,2014. - режим доступа: <http://elibrary.ru/item.asp?id=22296590>, свободный. - Загл. с экрана.

5 Валеева, Н.Ш., Хасанова, Г.Б. Биополимеры – перспективный вектор развития полимерной промышленности [Электронный ресурс]/ Н.Ш. Валеева, Г.Б. Хасанова// Journal of Siberian Federal University. Biology 2. - 2014. - Красноярск: СФУ,2014. - Загл. с экрана.

6 Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]:электрон. учеб. пособие/Н. А. Войнов, Т.Г.Волова, Н.В. Зобова и др.; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск:ИПК СФУ, 2009. – 418 с.

7 Экологическая биотехнология: учебн. пособие -2-е изд.дополн. и перераб./ Т.Г. Волова, Е.А. Афанасова, Е.С. Задереев и др.; по.ред. Т.Г. Воловой. - Красноярск: ИП Конюхова Л.В., 2014.-292 с.

8 Виноградова, О.Н., Сырвачева, Д.А. Лабораторные исследования деградации полигидроксиканоатов различной химической структуры в почве [Электронный ресурс]/ О.Н. Виноградова, Д.А. Сырвачева// Journal of Siberian Federal University. Biology 2. - 2015. - Красноярск: СФУ,2015. - Загл. с экрана.

9 Бояндин, А.Н., Прудникова, С.В., Филипенко, М.Л., Храпов, Е.А., Васильев, А.Д., Волова, Т.Г. Биodeградация полигидроксиканоатов почвенными микробиоценозами различной структуры и выявление микроорганизмов -деструкторов [Электронный ресурс]/ А.Н. Бояндин, С.В. Прудникова, М.Л. Филипенко и др.// Прикладная биохимия и микробиология, 2012, том 48,№1, с35-44. - Загл. с экрана

10 Билибин, Ю.А., Зорин, И.М. Деструкция полимеров ,ее роль в природе и современных медицинский технологий [Электронный ресурс]/Ю.А. Билибин, И.М. Зорин// Успех химии (2). - 2006. - Санк-Петербург. - Загл. с экрана.

11 Исмагилова, Г.Р. Биоразлагаемые полимеры на основе полиэфиров гидроксикарбоновых кислот [Электронный ресурс]/Г.Р. Исмагилова// Башкирский государственный университет. -2012. - Уфа. - Заг. с экрана.

12 Виноградова, О.Н., Волова, Т.Г. Биосинтез и свойства ПГА, содержащих мономеры 3-гидрокси-4-метилвалерата [Электронный ресурс]/О.Н. Виноградова, Т.Г. Волова// Journal of Siberian Federal University. - 2016. - Красноярск: СФУ, 2016. - Загл. с экрана.

13 Ojumu, T.V., Yu, J., Solomon, B.O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer [Electronic resource] / T.V. Ojumu // African Journal of Biotechnology. – 2004. – Vol.3. – Режим доступа: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/14910/58822>. – Загл. с экрана.

14 Monshupanee T., Palida Nimdach P., Incharoensakdi A. Two-stage (photoautotrophy and heterotrophy) cultivation enables efficient production of bioplastic poly-3-hydroxybutyrate in autosedimenting cyanobacterium [Electronic

resource]/ Monshupanee T.// Scientific Reports. - 2016. - Vol. 6. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5109257/>. - Загл. с экрана

15 Naheed N., Jamil N. Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in *Enterobacter sp. SEL2* [Electronic resource] /Naheed N.// Brazilian Journal of Microbiology. - 2014. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166265/>. - Загл. с экрана

16 Sagrario Arias, Monica Bassas-Galia, Gabriella Molinari, Kenneth N. Timmis Tight coupling of polymerization and depolymerization of polyhydroxyalkanoates ensures efficient management of carbon resources in *Pseudomonas putida* [Electronic resource] / Sagrario Arias //Microbial biotechnolgy. - 2012. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3918157/>. - Загл. с экрана

17 Quelas, J. I., Mongiardini, E. J., Perez-Gimenez, J., Parisi, G., Lodeiroa, A.R. Analysis of Two Polyhydroxyalkanoate Synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 [Electronic resource] / Quelas, J. I.// American Society for Microbiology. - 2013. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3697631/>. - Загл. с экрана

18 Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // eXPRESS Polymer Letters. - 2011. - Vol.5. - №7. P.620-634

19 Sudesh K. Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates / K. Sudesh, H. Abe // Smithers Rapra, 2010.

20 Anis S. N. S. Increased recovery and improved purity of PHA from recombinant *Cupriavidus necator* / Siti Nor Syairah Anis, Nurhezreen Md Iqbal, Sudesh Kumar & Amirul Al-Ashraf // Bioengineered. - 2013. - №4(2). - P. 115-118.

21 Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh// Polymer Letters - Vol.5 -№ 7 - 620–634.– 2011.

22 Steinbüchel A., Aerts K., Babel W., Föllner C., Liebergesell M., Madkour M.H., Mayer F., Pieper-Fürst V., Pries A., Valentin H.E., Wieczorek R.

Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acids inclusions //Can. J. Microbiol. – 1995a. – V.41. – №1. – P.94-105.

23 Yasotha K. et al. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration //Biochemical engineering journal. – 2006. – T. 30. – №. 3. – C. 260-268.

24 Jacquel N. et al. Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates) //Biochemical Engineering Journal. – 2008. – T. 39. – №. 1. – C. 15-27.

25 Yang Y. H. et al. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) //Biotechnology letters. – 2011. – T. 33. – №. 5. – C. 937-942.

26 JianYu. // US Patent 7514525. – 2009.

27 Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // eXPRESS Polymer Letters. - 2011. - Vol.5. - №7. P.620-634

28 Bury D. Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: A comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling / D. Bury, P. Jelen, M. Kaláb // Innovative Food Science and Emerging Technologies. - 2001. - № 2. - P. 23-29.

29 Gumel A. M., Annuar M. S. M., Chisti Y. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates //Journal of Polymers and the Environment. – 2013. – T. 21. – №. 2. – C. 580-605.

30 Khosravi-Darani K. et al. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly (R-hydroxybutyrate) recovery //Biotechnology progress. – 2004. – T. 20. – №. 6. – C. 1757-1765

31 Hejazi P., Vasheghani-Farahani E., Yamini Y. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly (β -hydroxybutyrate) Recovery //Biotechnology progress. – 2003. – T. 19. – №. 5. – C. 1519-1523.

32 Kapritchkoff F. M. et al. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha* // *Journal of biotechnology*. – 2006. – T. 122. – №. 4. – C. 453-462.

33 Kapritchkoff F. M. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha* / F.M. Kapritchkoff, P.A. Viott, R.C.P. Alli, M. Zuccolo, J.G.C Pradella, A.E. Maiorano, E. A. Miranda, A. Bonomi // *Journal of biotechnology*. – 2006. – Vol. 122, №. 4. – P. 453-462.

34 Muruga P. A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor* / P. Murugana, L. Hana, C-Y. Ganb, F. H.J. Maurerc, K. Sudesh // *Journal of Biotechnology*. - 2016. - №239. - P. 98-105.

35 Hahn S.K., Chang Y.K., Kim B.S. Et al. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersion of sodium hypochlorite solution and chloroform // *Biotechnol. Bioeng.* – 1994. – Vol. 44. – P. 256–261.

36 Rodrigues M.F.A., Silva LF, Gomez JGC, Valentin HE, Steibüchel A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypentonic acid) from unrelated substances by *Burkholderia* sp. // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 1995. – V. 43. – P. 880-886.

37 Van Hee P. et al. Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation // *Journal of colloid and interface science*. – 2006. – T. 297. – №. 2. – C. 595-606.

38 Andrey A. Gurtovenko, and Jamshed Anwar. Interaction of Ethanol with Biological Membranes: The Formation of Nonbilayer Structures within the Membrane Interior and their Significance Phys. // *J. Phys. Chem. B*. 2009. 113 (7), C 1983-1992.

39. Карпов А. М., Шакирзянов Г.З. Самозащита от алкоголизации. Образовательно-воспитательные основы профилактики и психотерапии зависимости от алкоголя. / А.М. Карпов. - М: Изд-во «Олита», 2004. - 52 с.

40 Осовская И.И., Антонова В.С. Вязкость растворов полимеров: учебное пособие. Изд-е 2-е, доп. / ВШТЭ СПбГУПТД. СПб., 2016.-62 с.

41 Вакуумная техника для научных и промышленных задач [Электронный ресурс]/ Agilent Technologies Inc. Режим доступа: <http://agilent.millab-vacuum.ru/primenenie/31-distillating>. - Загл. с экрана.

42 - Девярых Г.Г., Еллиев Ю. Е. Введение в теорию глубокой очистки веществ./ Г.Г Девярых. — М.: Наука, 1981. — 320 с.

43 Игнатович Э. Химическая техника. Процессы и аппараты. [Текст]/Э. Игнатович. - М:Техносфера, 2007. - 656 с.

44 Нетрусов А.И., Котова, Котова И.Б. Микробиология: учебник жля студентов высших учебных заведений./ А.И. Нетрусов.М: Изд-во «Академия»,2006 г. - 352 с.

45 - Волова Т.Г, Шишацкая Е.И., Разрушаемые биополимеры - получение, свойства, применение [Текст]/Т.Г. Волова. - Красноярск. Изд-во Красноярский писатель, 2011.- 392 с.

46 Киселев Е. Г.,Демиденко А.В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиканоатов из биомассы бактерий// Journal of Siberian Federal University. 2014. Biology 2. С. 148-160.

47 Andreas Wahl, Nora Schuth, Daniel Pfeiffer, Stephan Nussberger, Dieter Jendrosse. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*// . BMC Microbiology 2012, 12:262

48 Andréia Neves, José Müller. Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator*//Biotechnology progress, Volume28, Issue6 November/December 2012, Pages 1575-1580.

49 Chiara Samorì, Marina Basaglia, Sergio Casella, Lorenzo Favaro, Paola Galletti, Loris Giorgini, Davide Marchi, Laura Mazzocchetti, Cristian Torriac and Emilio Tagliaviniac. Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass//Green Chem., 2015,17, 1047-1056.


50 R.A.J. Verlinden, D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams, I. Radecka. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates// Journal Applied Microbiology, Volume102, Issue 6, June 2007, 1437-1449.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Никонова А.А. Изучение выхода экстрактивных веществ при экстракции полгидироксиалканоатов// Сборник статей Международной научно-практической конференции, Часть 2. Уфа: Научно-издательский центр «Аэтерна», 2018. - 15-20 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
 Т.Г.Волова
« 18 » июня 20 18 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Аппаратурно-технологическая схема постферментационной стадии опытного
производства СФУ

06.04.01 Биология

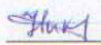
06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель

 14.06.18
подпись, дата


доцент, к.т.н. С.В.Барановский
инициалы, фамилия

Выпускник

 14.06.18
подпись, дата

А.А. Никонова
инициалы, фамилия

Рецензент

 16.06.18
подпись, дата

доцент, к.т.н. В.А.Кожухов
инициалы, фамилия

Красноярск 2018